

Multiplex Real-Time RT-PCR 法を用いたインフルエンザウイルスの迅速診断の検討

日大生産工(PD) ○根本 浩史
日大生産工 神野 英毅

緒言

近年、我々の安全・安心を脅かしているインフルエンザウイルスは、*Orthomyxoviridae*科に属するマイナス単RNAを遺伝子にもつウイルスであり、核タンパク (NP)とマトリックスタンパク (M)の抗原性の違いからA、B、C型に分別することができる。さらにA型はウイルス表面タンパクのHAとNAの組み合わせにより複数の亜型が存在する。これまでヒト間で流行しているのはA型のH1N1とH3N2、およびB型であるが、H5N1鳥インフルエンザのパンデミックが危惧されている。

我々が報告したラテックス免疫比濁法 (LTIA 法)を用いたインフルエンザの迅速診断法は、インフルエンザウイルスのハイスループットな定量が行える¹⁾。しかし、その感度、特異性を補うためにも、別途ウイルス確定検査が必要である。これにより高感度なウイルス分離培養法や RT-PCR 法が選択として挙げられるが、操作が複雑であり、インフルエンザ流行時に要求される短時間、多検体の測定には不向きである。

一方、リアルタイムPCR法は遺伝子増幅過程を光学的に測定することで、増幅に必要な温度サイクルの回数から遺伝子定量が可能であり、アガロース電気泳動などのPCR後の操作が不要なため、より迅速かつ簡便な遺伝子学的測定法である。また、複数種類のプライマーが同じ反応系で共存する Multiplex PCR 法を適用することでウイルス型を同時に分別することができ、測定操作の効率化が期待できる。

そこで本研究では、より迅速なインフルエンザの確定検査を目的として、同一反応液 1 段階で行える Multiplex real-time RT-PCR (M-RRT-PCR 法)に着目し、遺伝子学的なインフルエンザウイルスの定量とウイルス型分別の同時測定を検討した。

材料、実験方法

1、使用サンプルおよびプライマー

検討した標準ウイルスサンプルとして Influenza A 型 (Singapore/63/04 H1N1) および Influenza B 型 (Yamanashi/166/98) 不活化ウイルス粒子 (Zepto Matrix, USA)を使用した。プライマーは Suwannakarn らの報告²⁾を参照として、A 型、B 型ともそれぞれインフルエンザウイルス M 部位を標的遺伝子とした Table 1 に示すプライマーを作製し

Table 1 Primers for use in influenza virus multiplex real-time RT-PCR

Type, gene	Name	Sequence (5'-3')	Position
A, M	FLA-M-F151	CATGGARTGGCTAAAGACAAGACC	151-171
	FLA-M-R276	AGGGCATTGTTGGACAAKCGTCTA	276-252
B, M	FLB-M-F439	CTCTGTGCTTTTGTGCGARAAAC	439-460
	FLB-MR	CCTTCYCCATTCTTTTGACTTGC	671-649

BLAST 検索により相同性を確認した。

2、ウイルス RNA の抽出

インフルエンザウイルスの RNA は、QIAamp Viral RNA Mini キット (Qiagen, USA) を使用して付属の説明書に従い抽出操作を行った。抽出 RNA サンプルは使用直前まで氷温で保存し、一部は -30℃にて凍結保存した。

3、M-RRT-PCR 法による測定

抽出 RNA サンプルからの 1 段階 MR RT-PCR 法は One Step SYBR Primescript RT-PCR kit II (タカラバイオ)を用いて行った。上記のプライマー 2 セットおよび RNase フリー水にて段階希釈した抽出 RNA サンプルを直接使用し、Table 2 に示す組成の反応液を調製した。PCR 反応は LightCycler II リアルタイム PCR 測定装置 (Roche Diagnostics, USA)を用い、調製した反応液を専用ガラスキャピラリーに分注し遠心分離して装置にセット後、Table 3 に示す温度条件で行った。PCR 反応後、続けて溶解曲線解析を行い、融解温度 (MP)の差異よりウイルス型の分別を行った。

Table 2 Composition of reaction reagent for one-step multiplex real-time RT-PCR

Reagent	Volume (μ l / reaction)
RNase Free H ₂ O	5.6
2X One Step SYBR RT-PCR Buffer ⁴	10
PrimeScript 1Step Enzyme	0.8
Each Primer (10pmol/ μ l)	0.5/each
RNA Sample	2.0
Total	20.0

Table 3 Condition of one-step multiplex real-time RT-PCR

Condition	Acquisition
Stage1 Revers transcription	
42°C 5 min	
95°C 10 sec	
Stage2 PCR / 40 cycles	
95°C 5 sec	None
60°C 20 sec	Single
Stage3 Melting peak analysis	
95°C 0 sec	
65°C 15 sec	Melting
95°C 0 sec	

結果

1、Multiplex real-time RT-PCR 法の反応性

各インフルエンザウイルスより抽出したRNAを10倍ずつ段階希釈し、測定した結果をFig. 1に示す。サンプル濃度が濃いほど少ない増幅回数にてSYBR Greenの蛍光反応の上昇が観察できた。インフルエンザA型は10の5乗希釈、B型は4乗希釈程度まで、およそ等サイクル間隔でノイズがない明確なシグナルが得られた。しかしながら、34サイクル以降にて水をサンプルに用いたブランクに非特異的な反応が確認された。次に、この反応の立ち上がるサイクル回数(CP)をY軸に、サンプル希釈率の次数をX軸にとり、作製した検量線をFig. 2に示す。10の4乗希釈までの範囲でそれぞれ直線的な検量線を作製することができ、インフルエンザA型では $R^2=0.9918$ 、B型では $R^2=0.9881$ の良好な相関が得られた。それぞれの検量線の傾きから求めた反応効率も、インフルエンザA型では約107%、B型では126%となった。

2、溶解曲線解析によるウイルス型の判別

PCR反応後に続けて行った溶解曲線解析によるインフルエンザウイルス型の判別の結果をFig. 3に示す。各サンプルの増幅産物ともに85°C付近に頂点が存在した。それぞれのMPはインフルエンザA型が約84°C、B型が約85°Cであり、MPの差異からA型とB型の判別が行えた。75°Cから85°C付近までブランクの幅広いピークが確認されたが、これはプライマーダイマーが形成されているものと判断した。

考察

本研究で検討したM・RRT-PCR法は抽出したRNAを直接使用し、インフルエンザA型、B型の試薬を同一反応液とした、別途逆転写反応を行わない1段階測定法である。そのため、試薬分注などの操作が省かれ、測定開始から40分程度で結果が判明することから、より迅速かつ高効率な測定が可能である。また、SYBR Green Iの使用によりコスト的にも優れていると考えられる。本法ではCPよりインフルエンザウイルス遺伝子の高感度定量が可能であり、良好な相関が確認できた。しかし、その増幅効率は100%を超えており、溶解曲線解析からもプライマーダイマーが検出されたため、より詳細なPCR条件の検討が必要である。また、MPの差異からウイルス型の判別が行えたが、その温度差は約1°Cと僅かであるため判別が困難なことが予測される。Multiplex PCRでは各遺伝子標的が同一条件で反応することが要求されるが、MPの差をより明確にするためにはプライマーおよびその増幅産物長を変更する必要があると考えられる。

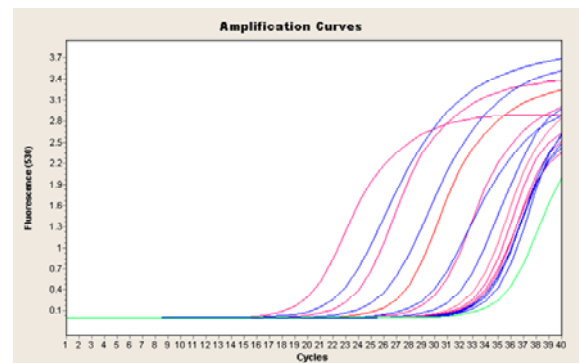


Fig. 1 Amplification curve of influenza virus type A and B detection by multiplex real-time RT-PCR
Red : Influenza A Blue : Influenza B Green : Blank

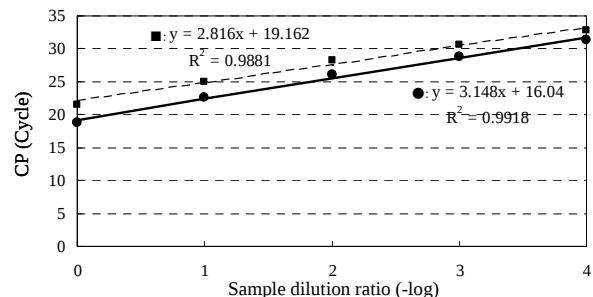


Fig. 2 Standard curve between crossing point and dilution ratio of sample RNA.

● : Influenza A ■ : Influenza B

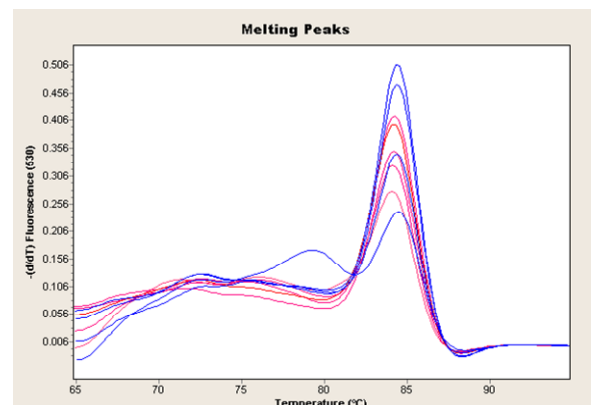


Fig. 3 Typing of influenza virus A and B genes by melting-curve analysis
Red : Influenza A Blue : Influenza B Green : Blank

結論

迅速なインフルエンザの確定検査を行うために、Multiplex real-time RT-PCR法を用いたインフルエンザウイルスの遺伝子定量とウイルス型の同時判別を検討した。本法は改善の余地があるものの迅速、高効率な測定が可能であり、LTIA法と組み合わせることでインフルエンザ流行時にも対応可能な、多角的な診断が期待できる。

参考文献

- 1) H. Nemoto, T. Komoriya, H. Kohno, "Development of Latex Turbidimetric Immunoassay for Rapid and Sensitive Detection of Influenza Virus", JARMAM, 18, (2007), p117-126
- 2) K. Suwannakarn *et al.*, "Typing (A/B) and subtyping (H1/H3/H5) of influenza A viruses by multiplex real-time RT-PCR assays", J Virol Methods, 152, (2008), p25-31